

特定激活性吞噬受体的配体与广谱肿瘤 抗原的化学生物学桥接

张国秀, 郑晨晨, 赵智辉

(南京师范大学生命科学学院, 生物化学与生物制品研究所, 江苏省分子与医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 目前肿瘤疫苗制备方法尚无法做到将广谱肿瘤抗原通过特定激活性吞噬受体途径递送给抗原呈递细胞, 这可能是现有肿瘤疫苗临床疗效不佳的原因之一。因此, 本研究利用化学生物学方法, 尝试将激活性吞噬受体的配体与广谱肿瘤抗原连接, 为制备肿瘤疫苗提供新的方法。首先, 通过非天然糖代谢掺入对培养的小鼠 4T1 乳腺癌细胞和 CT26.WT 结直肠癌细胞抗原进行标记, 使糖基化肿瘤抗原携带叠氮化的唾液酸, 利用流式细胞术和免疫荧光技术确定代谢掺入的最优条件参数。其次, 利用生物正交反应使肿瘤抗原叠氮修饰位点再进一步共价缀合生物素, 利用 Western Blot 检测蛋白的生物素化情况。最后, 利用抗原-抗体结合原理, 将小鼠抗生物素单抗(IgG1 亚型, 其 Fc 结构域是 IgG1FcR 的配体)与生物素化肿瘤抗原交联形成免疫复合物, 通过 Western Blot 判断最优交联参数。实验结果表明, 唾液酸前体物代谢掺入能高效地使肿瘤细胞发生叠氮化修饰, 最佳浓度是 2 mmol/L、最佳时间是 24 h; 通过生物正交反应能使叠氮化肿瘤抗原进一步生物素化; 生物素化肿瘤抗原能高效地与抗生物素抗体形成复合物, 二者交联的最佳比例(w/w)是 20/1(4T1)或 25/1(CT26.WT)。结果证明, 本研究通过化学生物学手段实现了广谱肿瘤抗原与特定吞噬受体的配体的交联, 在方法学上为研制新型肿瘤疫苗奠定了基础。

[关键词] 代谢掺入, 生物正交反应, 激活性吞噬受体, 抗原递送, 肿瘤疫苗

[中图分类号] R730.3 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2020)02-0092-08

Biochemical Bridging of Ligand for Specific Activating Phagocytic Receptor and Broad-Spectrum Tumor Antigens

Zhang Guoxiu, Zheng Chenchen, Zhao Zhihui

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Institute of Biochemistry and Biological Products,
Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: The current methods for preparing tumor vaccines has not been able to deliver broad-spectrum tumor antigens (TAGs) to antigen-presenting cells (APCs) through specific activating phagocytic receptor (SAPR) pathways, which may be one of the reasons for the poor clinical efficacy of existing tumor vaccines. Here, by using biochemical methods, it was tried to achieve the linkage of SAPR ligand with broad spectrum TAGs, attempting to provide a novel strategy for the preparation of tumor vaccines. Firstly, the antigens of 4T1 breast cancer cells or CT26.WT colorectal cancer cells were decorated by metabolic incorporation (MI) of non-natural carbohydrates, so that glycosylated tumor antigens could carry azide group on sialic acid residue, the optimal parameters of MI were determined by flow cytometry and immunofluorescent assay. Secondly, the azide modified sites of TAGs were further covalently conjugated with biotin through bio-orthogonal reaction, and the biotinylated tumor antigens (bio-TAGs) were detected by Western Blot. Finally, based on the principle of antigen-antibody binding, mouse anti-Biotin monoclonal antibody (anti-Biotin mAb, IgG1 subtype, whose Fc domain is a ligand of IgG1 FcR) was cross-linked with bio-TAGs to form immune complexes, and the optimal cross-linking parameters was determined by Western Blot. The results showed that TAGs were efficiently modified by azide through MI, the optimal cultural concentration of sialic acid precursor is 2 mmol/L, and the optimal time of MI is 24 h. The azide labeled TAGs can further become biotinylated via bio-orthogonal reaction, the bio-TAGs can efficiently cross-linked with the anti-Biotin mAb to form immune complexes, and the optimal ratio(w/w) of anti-Biotin mAb and bio-TAGs for cross-linkage are 20/1 (4T1) or 25/1 (CT26.WT). It is concluded that broad-spectrum tumor antigens can cross-link with

收稿日期: 2019-12-15.

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划集成项目子课题(2013104GZ90073).

通讯作者: 赵智辉, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤疫苗治疗. E-mail: zhaozhihui_1964@aliyun.com

SAPR ligand by biochemical methods, which lays a foundation for the development of new tumor vaccines.

Key words: metabolic incorporation, bio-orthogonal reaction, activating phagocytic receptor, antigen delivery, tumor vaccine

2018 年 GLOBOCAN 数据统计表明全球乳腺癌 (Breast Cancer, BC) 和结直肠癌 (ColoRectal Cancer, CRC) 的发病率及死亡率都位居前列^[1]。三大传统疗法治愈率低且存在严重毒副作用,免疫治疗越来越受到重视,成为肿瘤治疗史上的重大突破^[2]。在免疫治疗中,肿瘤疫苗具有耐受性好、低毒性和易于注射等优点而受到专门研究,但存在疫苗免疫原性低、肿瘤异质性、肿瘤免疫逃避及抑制性肿瘤微环境等问题^[3-5],使其尚未表现出显著的临床益处,这就亟需探索更有效的肿瘤疫苗制备方法。

目前,制备肿瘤疫苗的方法主要有以下几种:反复冻融法获取的肿瘤细胞全蛋白作为肿瘤疫苗;合成已经明确的肿瘤抗原肽作为肿瘤疫苗;特定肿瘤抗原肽与特定激活性受体结合(如 HER2 与 Fc 的融合蛋白)^[6]制备肿瘤疫苗;深度测序法鉴定肿瘤特异性新抗原(Tumor Specific neo-Antigen, TSNA)后进行抗原合成^[7]制备肿瘤疫苗;将肿瘤抗原基因导入适当的细胞内,以表达该基因的肿瘤细胞作为肿瘤疫苗使用;以及负载肿瘤抗原的树突状细胞(Dendritic Cells, DCs)^[8]作为肿瘤疫苗等等。根据以上方法制备的肿瘤疫苗形式多样,包括肽疫苗、DNA 或 RNA 疫苗、DC 疫苗和全细胞疫苗等,但是每种疫苗应用时存在一定的弊端,比如肽疫苗需要合适的免疫佐剂,且具有 HLA 限制;DNA/RNA 疫苗有毒副作用、裸露的 DNA 或者质粒效果微弱、较难发现合适的载体;DC 疫苗的制备成本高且 DCs 的分离、扩增、刺激成熟等过程仍具有技术挑战^[9];全细胞疫苗可能会引发自身免疫,并且难以监测未知 TAA 产生的免疫应答。这些方法在临床试验中未能展现出良好的治疗效果,可能的根本原因之一是尚无法做到将广谱肿瘤抗原通过特定激活性吞噬受体途径递送给 APCs。

目前,真正能诱发机体产生抗肿瘤免疫应答的是 TSNA,而 TSNA 的鉴定非常耗时耗财。因此,经济快捷地制备覆盖尽可能多 TSNA 的广谱肿瘤抗原,并使其通过激活性内吞受体递送从而激活免疫系统是一个可行的策略。

本研究利用糖代谢掺入^[10]和生物正交反应^[11],将肿瘤细胞表面唾液酸化肿瘤抗原与特定激活性吞噬受体的配体进行桥接,尝试制备一种能够有效激活机体体液免疫和细胞免疫的肿瘤疫苗。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

四乙酰叠氮甘露糖胺 (Tetraacetylated N-Azidoacetyl-D-Mannosamine, Ac4ManNAz)、Alexa Fluor 488 DIBO Alkyne、Click-iT DIBO-biotin 和 ProLong® Gold Antifade Reagent 购自 Thermo Fisher 公司;唾液酸 (N-Acetylneuraminic acid) 购自 Sigma 公司;Anti-biotin, HRP-linked Antibody 购自 CST 公司;IgG Fraction Monoclonal Mouse Anti-Biotin 购自 Jackson ImmunoResearch 公司;BCA 蛋白定量试剂盒、Protein G Beads 和 Protein G 磁珠购自 Bioworld 公司;无酶细胞消化液、D-PBS 购自 Gibco 公司;蛋白酶抑制剂混合物购自 Bimibe 公司;蛋白分子量标准购自 Thermo 公司;多聚甲醛购自上海凌峰化学试剂有限公司;无水乙醇购自广东光华科技股份有限公司;RIPA Lysis Buffer、苯甲基磺酰氟 (PMSF) 由本实验室配制。

细胞培养所使用的青霉素、链霉素、0.25% 胰蛋白酶和 RPMI 1640 培养基购自 WISENT 公司;胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 购自康源公司。

1.2 主要仪器

D-37520 台式离心机、BB5060UV 细胞培养箱、HEAL FORCE 生物安全柜、ELx 808 酶标仪、SS-325 高压蒸汽灭菌锅、DC1010 恒温水浴锅、IX51 倒置荧光显微镜、PB-20 酸度计、SIM-F124 雪花状制冰机、PowerPac 200/HC/3000 电泳仪、Guava EasyCyte Mini System 流式细胞仪等。

1.3 细胞与细胞培养

小鼠 4T1 乳腺癌细胞和 CT26.WT 结直肠癌细胞(购自中国科学院细胞库)在 37℃、5% CO₂ 的条件下,用含 10% FBS 和抗生素(100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)的 RPMI 1640 完全培养液培养。

1.4 流式细胞术

收集对数生长期的 4T1 和 CT26.WT 细胞,计数,铺 2×10⁴ 细胞于 96 孔板培养 24 h,共 14 孔。吸去

7个孔上清后,不同浓度 Ac4ManNAz 培液(0、0.1、0.25、0.5、1、2、3) mmol/L 继续共培养 24 h. 弃剩余 7 个孔上清,3 mmol/L Ac4ManNAz 培液继续培养细胞指定时间(0、4、8、12、16、20、24) h. 用含 1% FBS 的 D-PBS 洗 3 次. 无酶消化液收集细胞,与含 1% FBS、50 μ mol/L Alexa Fluor 488 DIBO Alkyne 的 D-PBS 混合,轻轻吹打混匀,室温、避光孵育 60 min. 用含 1% FBS 的 D-PBS 洗 4 次. 用含 4% 多聚甲醛的 D-PBS 固定细胞 15 min. 用 D-PBS 洗细胞 3 次. 用 0.5 mL D-PBS 重悬细胞. 流式细胞仪检测.

1.5 免疫荧光技术

收集对数生长期的 4T1 和 CT26.WT 细胞,计数, 2×10^4 细胞分别与 2 mmol/L Ac4ManNAz 和 2 mmol/L Sia 培液混匀,加入腔室培养室(各 2 个复孔),培养 24 h. 用含 1% FBS 的 D-PBS 洗 3 次. 50 μ mol/L Alexa Fluor 488 DIBO Alkyne 的 D-PBS 与细胞混合,室温、避光孵育 60 min. 用 3% BSA 的 D-PBS 洗 3 次. 用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, 0.25% Triton ® X-100 的 D-PBS 打孔细胞,室温 15 min. 用含 1% BSA 的 D-PBS 洗 3 次. 室温下干片(至无明显液体),将培养玻片与腔体分离. 在培养细胞处滴加 ProLong ® Gold Antifade Reagent 1 滴,使其覆盖载玻片上的细胞;加盖清洁的盖玻片(片下不能有气泡),室温下水平搁置、避光干燥 24 h,使封片剂固化. 荧光显微镜观察、采集图像.

1.6 生物正交反应

2 mmol/L Ac4ManNAz 培液于 10 cm 皿中培养 4T1 和 CT26.WT 细胞 24 h. 用 1 \times PBS 清洗细胞 2 次. 1 mL 冷 RIPA 裂解液(裂解液:蛋白酶抑制剂:PMSF=100:1:1)裂解细胞,晃动培养皿使裂解液覆盖整个皿底,放置冰上 30 min,每隔 10 min 晃动一次. 刮下细胞,将细胞裂解液吸至 1.5 mL EP 管. 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 500 rpm,离心 10 min. 转移上清至 1.5 mL EP 管,99 $^{\circ}\text{C}$ 加热 6 min,置于冰上 10 min. 加入 150 μ L 2 mmol/L DIBO-Biotin 充分混匀,室温孵育 2 h. 孵育结束后,取适量样品进行 BCA 蛋白定量和 Western Blot 分析.

1.7 冰乙醇沉淀蛋白

取 100 μ L 生物素化蛋白溶液于 1.5 mL EP 管,沿管壁分次、缓慢加入 1 mL 冰乙醇($v/v=1/10$),边加边涡旋,-80 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜.

1.8 免疫沉淀

取-80 $^{\circ}\text{C}$ 醇沉生物素化蛋白,4 $^{\circ}\text{C}$, 12 500 rpm,离心 10 min. 弃上清,用 1 mL 冰乙醇清洗蛋白沉淀 2 次. 将 EP 管置于冰上,待残留乙醇挥发干净. 用 50 μ L~100 μ L PBS 溶解蛋白沉淀. 完全溶解后,取适量样品进行 BCA 蛋白定量. 根据蛋白定量结果,取含 200 μ g 生物素化蛋白溶液于 1.5 mL EP 管,加入 10 μ L 1.3 μ g/ μ L anti-Biotin 抗体,涡旋混匀. 4 $^{\circ}\text{C}$ 震荡孵育过夜.

取 100 μ L Protein G Beads 于 0.5 mL EP 管. 4 $^{\circ}\text{C}$, 300 rpm,离心 1 min. 弃上清,用 500 μ L 1 \times PBS 清洗 Protein G Bead 3 次,每次需静置 5 min. Protein G Beads 与上述抗原抗体孵育物充分混合,4 $^{\circ}\text{C}$ 震荡孵育过夜. 4 $^{\circ}\text{C}$, 300 rpm,离心 1 min. 转移上清至 0.5 mL EP 管. 用 200 μ L 1 \times PBS 清洗 Protein G Beads 3 次,保留洗液. 用 50 μ L 1 \times Loading buffer 重悬 Protein G Beads,99 $^{\circ}\text{C}$,煮样 5 min. 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 500 rpm,离心 1 min. 分别取上清、洗液和 Protein G Beads 样品进行 Western Blot 分析.

1.9 生物素化抗原与 anti-Biotin 抗体最佳结合比例

4 管 200 μ g 醇沉生物素化蛋白(4T1 和 CT26.WT 细胞)与不同量 anti-Biotin 抗体(1、2.5、5、10) μ g 混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜. 取 200 μ L 磁珠 G 于 0.5 mL EP 管,4 $^{\circ}\text{C}$, 4000 rpm,离心 3 min. 弃上清,用 500 μ L 1 \times PBS 清洗磁珠 G 3 次,每次需静置 5 min. 用 200 μ L 1 \times PBS 重悬磁珠 G,将其平分为 4 管,50 μ L/管. 4 $^{\circ}\text{C}$, 4 000 rpm,离心 3 min. 弃上清,磁珠 G 与上述抗原抗体孵育物混匀,室温孵育 2 h. 4 $^{\circ}\text{C}$, 4000 rpm,离心 3 min,转移上清至 EP 管. 用 200 μ L 1 \times PBS 清洗磁珠 G 3 次,保留洗液. 用 50 μ L 1 \times Loading buffer 重悬磁珠 G, 99 $^{\circ}\text{C}$,煮样 5 min. 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 500 rpm, 1 min. 分别取上清、洗液和磁珠 G 样品进行 Western Blot 分析.

1.10 肿瘤疫苗的制备

细胞传代时用 0.5 mmol/L Ac4ManNAz 培液培养 4T1 和 CT26.WT 细胞 24 h 后,2 mmol/L Ac4ManNAz 培液再培养细胞 24 h. 收集细胞进行裂解获得蛋白裂解液,加热变性后进行生物正交反应. 用冰乙醇沉淀法除去蛋白溶液中未反应的生物素. 用适量 PBS 复溶生物素化蛋白,并与适量 anti-Biotin 抗体混合,4 $^{\circ}\text{C}$ 震荡孵育过夜.

1.11 统计学分析

实验数据采用均值±标准差 (Means±SD) 表示,用 One-way ANOVA 或 *t* 检验来分析数据间的差异显著性,图由 GraphPad5.0 软件完成. 实验重复 3 次以上, $P<0.05$,则具有统计学显著差异.

2 结果与讨论

2.1 Ac4ManNAz 代谢掺入到细胞的最佳掺入参数

流式细胞分析 Ac4ManNAz 代谢掺入条件参数,结果如图 1 所示. 从图 A 和 C 可以看出,随着 Ac4ManNAz 浓度的增加,4T1 和 CT26.WT 细胞的平均荧光强度逐渐增强,两者成正相关. 从图 B 和 D 可以看出,3 mmol/L Ac4ManNAz 培养细胞不同时间,随着培养时间的延长,4T1 和 CT26.WT 细胞的平均荧光强度先增加后降低再增加,呈折线形变化,且相邻培养浓度(时间)间具有显著性差异 (** $P<0.01$, *** $P<0.001$). 通过对总荧强度的分析,选择 Ac4ManNAz 最佳掺入浓度是 2 mmol/L,最佳培养时间是 24 h.

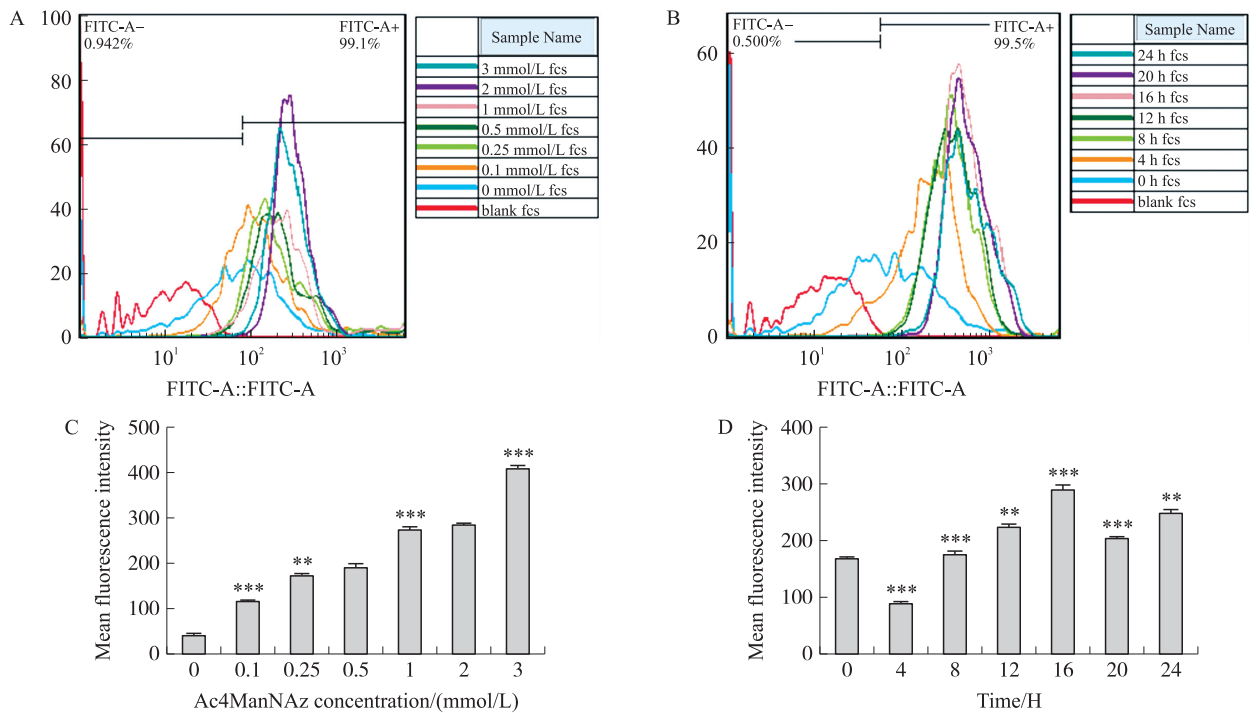


图 1 流式细胞术检测 Ac4ManNAz 代谢掺入参数

Fig. 1 Flow cytometry detection of Ac4ManNAz metabolic incorporation parameters

2.2 Ac4ManNAz 通过糖代谢掺入到细胞

用免疫荧光技术直观考察 Ac4ManNAz 代谢掺入情况,结果如图 2 所示(A 代表 4T1 细胞、B 代表 CT26.WT 细胞),两种细胞的 Ac4ManNAz 实验组有荧光且非常强烈,而 Sia 对照组没有荧光. 这表明 Ac4ManNAz 能通过细胞糖代谢途径掺入到 4T1 和 CT26.WT 细胞表面含唾液酸的糖蛋白中,使糖蛋白带上叠氮基团.

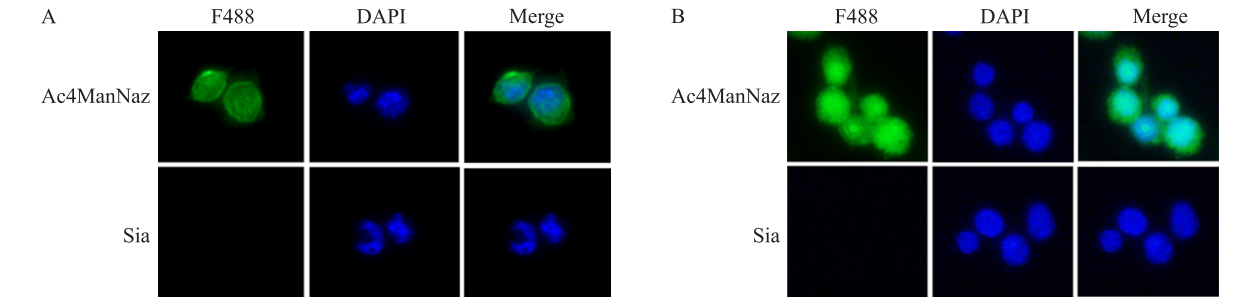
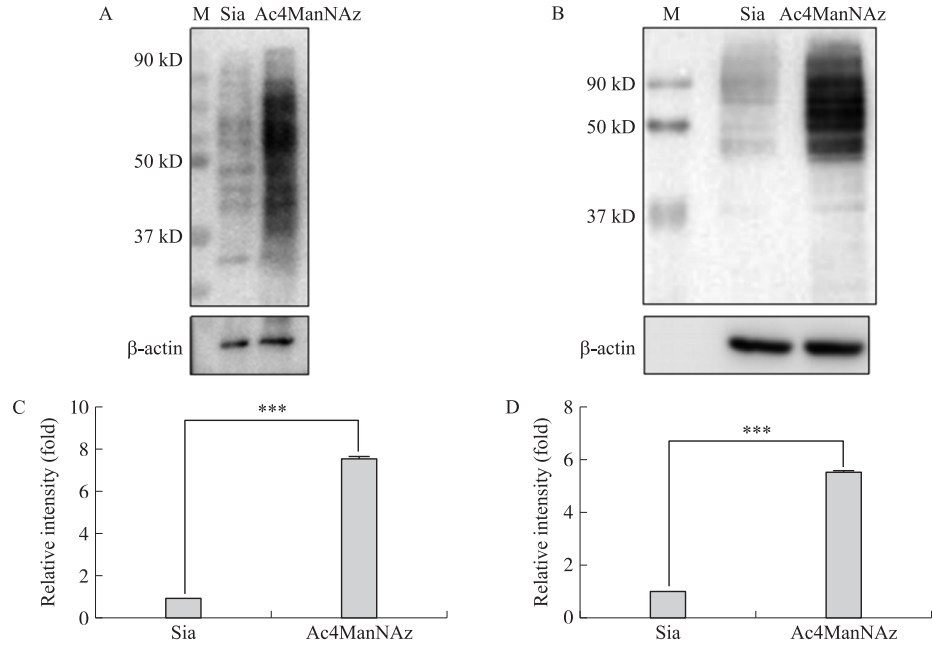


图 2 免疫荧光检测 Ac4ManNAz 代谢掺入

Fig. 2 Immunofluorescence detection of Ac4ManNAz metabolic incorporation

2.3 Biotin-DIBO 使叠氮化蛋白生物素化

收集 Ac4ManNAz 和 Sia 代谢掺入的肿瘤细胞蛋白溶液,变性后与 Biotin-DIBO 进行生物正交反应,Western blot 检测叠氮化蛋白的生物素化情况,结果如图 3 所示. 从图 A 和 B 可以看出,Ac4ManNAz 实验组有目的条带,且比 Sia 对照组条带明显,说明 Biotin-DIBO 能高效地使叠氮修饰的糖蛋白生物素化.



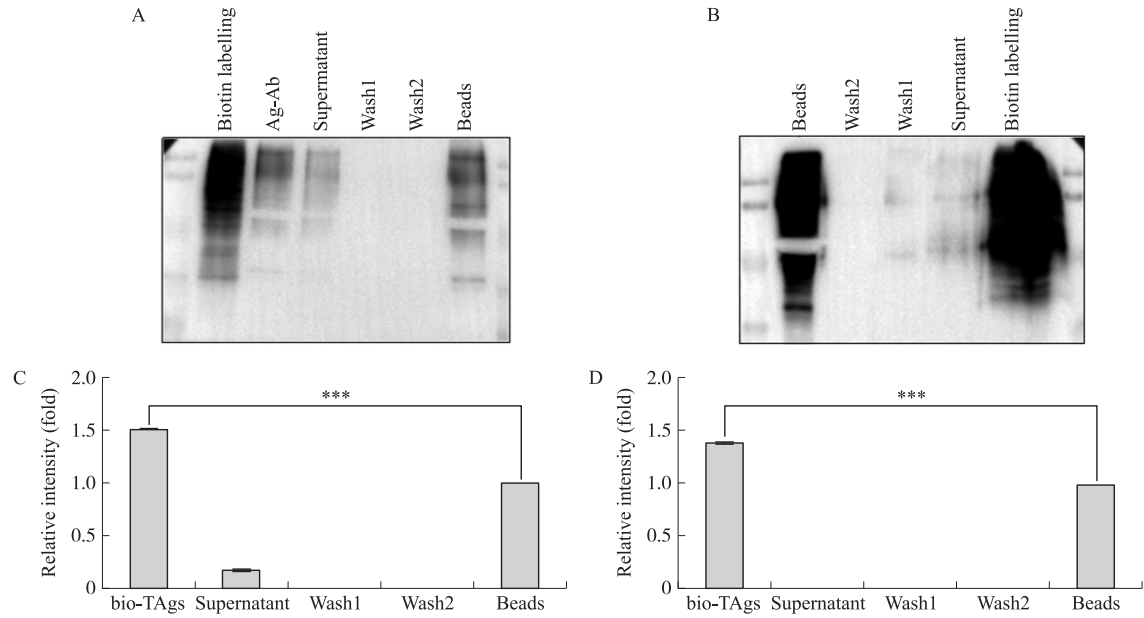
Ac4ManNAz 和 Sia 对 4T1 和 CT26.WT 肿瘤细胞进行代谢标记,然后进行生物正交反应,WB 测蛋白的生物素化(A 代表 4T1 细胞、B 代表 CT26.WT 细胞). C、D 分别是对 A 和 B 结果进行的灰度分析. $n=3$, *** $P<0.001$.

图 3 肿瘤蛋白生物素化的鉴定

Fig. 3 Identification of tumor protein biotinylation

2.4 生物素化蛋白与 anti-Biotin 抗体交联成免疫复合物

醇沉生物素化蛋白与 anti-Biotin 抗体混匀,4 ℃ 震荡孵育过夜,Protein G Beads 富集交联复合物进行 Western blot 分析,结果如图 4 所示. Protein G Beads 样品有生物素化蛋白条带,而上清、一洗和二洗样品中



生物素化蛋白与适量 anti-Biotin 抗体进行免疫沉淀反应,WB 检测蛋白交联情况(A 代表 4T1 细胞、B 代表 CT26.WT 细胞). C、D 分别是对 A 和 B 结果进行的灰度分析. $n=3$, *** $P<0.001$.

图 4 免疫复合物的鉴定

Fig. 4 Identification of immune complexes

几乎没有目的条带,从而证明生物素化蛋白能与 anti-Biotin 抗体交联成免疫复合物,且是高效的.

2.5 生物素化蛋白与 anti-Biotin 抗体的最佳结合比例

100 μg 醇沉生物素化蛋白与不同量的 anti-Biotin 抗体混合,4 $^{\circ}\text{C}$ 震荡孵育过夜后,磁珠 G 负载交联复合物进行 Western blot 分析,结果如图 5 所示(A 代表 4T1 细胞、B 代表 CT26.WT 细胞). 从图 A 和图 B 可以看出,随着 anti-Biotin 抗体量的增加,交联复合物的量也增加,两者成正相关;但对于 CT26.WT 细胞,当抗体量为 2.5 μg 和 5 μg 时,交联复合物条带几乎一致,说明 2.5 μg anti-Biotin 抗体几乎已达到饱和. 综合考虑,4T1 细胞的抗原抗体最佳孵育比例是 20:1,而 CT26.WT 细胞的孵育比例是 25:1.

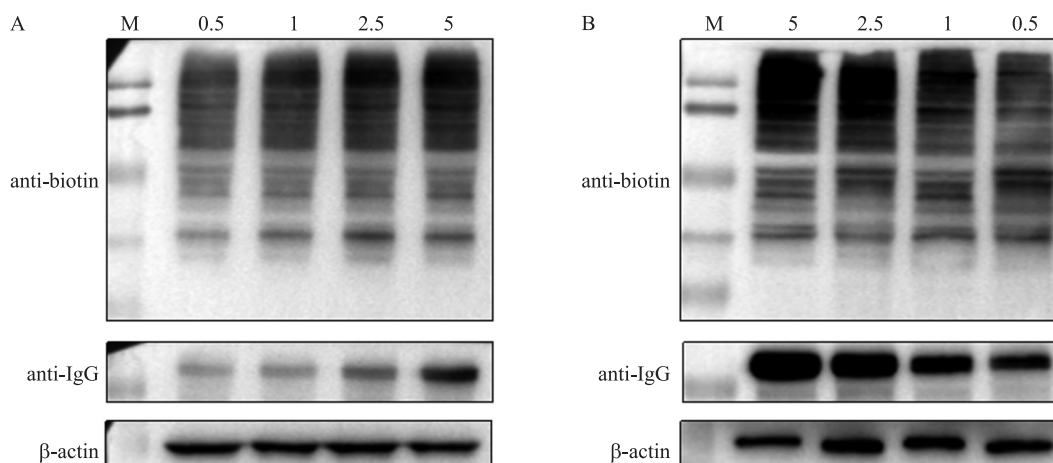


图 5 生物素化蛋白与 anti-Biotin 抗体最佳结合比例的鉴定

Fig. 5 Identification of the optimal binding ratio of bio-TAGs to anti-Biotin antibody

2.6 肿瘤疫苗制备的检测

蛋白免疫印迹及免疫沉淀技术对制备疫苗的各步骤进行检测,确保叠氮糖的代谢掺入、生物正交反应以及抗原抗体反应等步骤的有序进行,保证疫苗组成成分的均一性及疫苗的有效性,结果如图 6 所示(A 代表 4T1 细胞、B 代表 CT26.WT 细胞). 从图 A 和 B 可以看出,用于免疫的肿瘤抗原都高度均一地进行生物素化标记,并能与 Anti-Biotin 抗体高效地交联成免疫复合物.

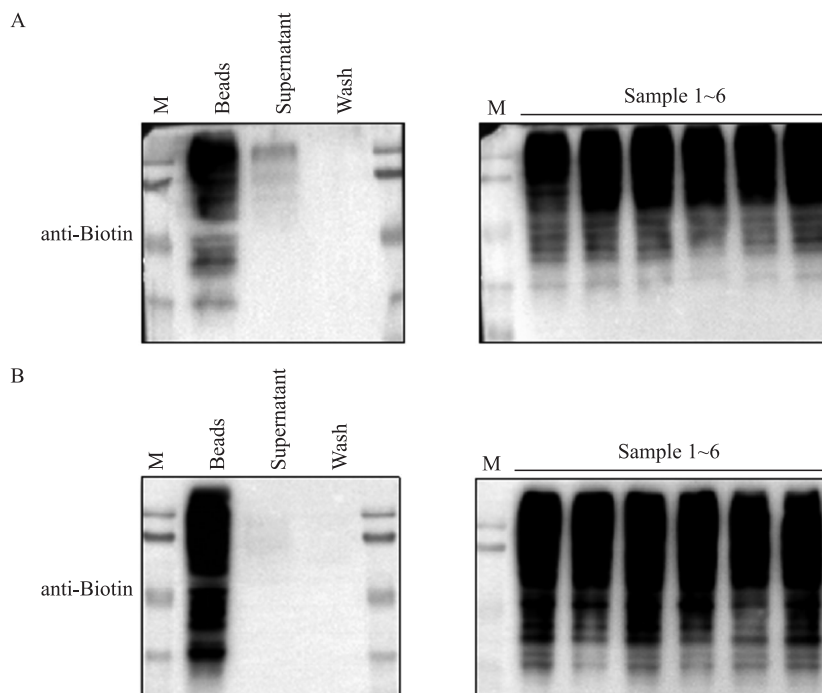


图 6 生物素化抗原及抗原抗体复合物检测

Fig. 6 Identification of bio-TAGs and crosslinked complexes

3 结论

肿瘤是世界范围内导致死亡的常见疾病,诸如乳腺癌、结直肠癌等难治性肿瘤,三大传统疗法尚且无法显著改善患者存活率,因此,治疗重心转向肿瘤免疫治疗。在过去的几十年里,肿瘤疫苗一直被专门研究,并在肿瘤治疗方面取得卓越成就。迄今为止,用于治疗 BC 和 CRC 的肿瘤疫苗虽能诱发机体产生免疫应答,但是应答持续时间短且强度弱。目前,还未有 FDA 批准的用于治疗 BC 的疫苗^[12],也没有一种治疗 CRC 的肿瘤疫苗在大型 III 期试验中显示出临床益处^[13-14]。

本研究结果显示,利用化学生物学方法,可将 4T1 和 CT26.WT 细胞广谱肿瘤抗原与 IgG1 亚型 Anti-Biotin 抗体桥接成免疫复合物(疫苗),使广谱抗原通过特定激活性吞噬受体(Fc Receptor, FcR)途径递送给 APCs。这种疫苗制备方法简单、快速且经济。理论上,叠氮化修饰封闭了肿瘤抗原上的唾液酸位点,避免了唾液酸化抗原介导的免疫耐受^[15];多种抗原通过 FcR 被 APCs 摄取后,能通过下游激活性信号基序诱发机体产生激活性抗肿瘤免疫应答,而非抑制性抗肿瘤免疫应答^[16-17],但是缺乏动物实验对疫苗的有效性进行验证。因此,在后续研究中,拟进行细胞学实验和动物实验以评估疫苗的免疫效果。在细胞水平上,分离、培养小鼠骨髓 DCs,检测肿瘤抗原对 DCs 表面分子及细胞因子表达的影响,包括 MHC I、MHC II、CD45、CD80、CD86、IFN- γ 、IL12 等;在动物水平上,以 BALB/c 小鼠为材料,建立预防性和治疗性小鼠异位移植瘤模型,检测小鼠肿瘤生长速率、存活率、外周血中不同类型淋巴细胞的数量如 CD8⁺T、CD4⁺T、调节性 T 细胞和特异性抗体。在建立动物模型时采用鼠源性细胞系而非个性化人源肿瘤细胞,因此,在验证鼠源肿瘤细胞抗原疫苗的有效性后,还需采用人源肿瘤细胞抗原对小鼠进行免疫以评估其有效性,且人源肿瘤细胞对人的抗原效果仍存在相应的不确定性。此外,免疫佐剂的选择、免疫剂量和时序等问题也有待研究^[18]。

总之,本研究利用化学生物学方法将特定激活性吞噬受体的配体与广谱肿瘤抗原桥接成免疫复合物,这只是实现相应目标的第一步,后续还需通过动物实验来评估疫苗的疗效,但也为临床上乳腺癌、结直肠癌乃至其他癌症的治疗提供了借鉴和参考,为肿瘤免疫治疗提供了新的方法和新的研究理论。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] MARTIN L J, OCHOA DE O M, HIERRO C, et al. The expanding role of immunotherapy[J]. Cancer treatment reviews, 2017, 54: 74-86.
- [3] YE Z, QIAN Q, JIN H, et al. Cancer vaccine: learning lessons from immune checkpoint inhibitors[J]. Journal of cancer, 2018, 9(2): 263-268.
- [4] MELERO I, GAUDERNACK G, GERRITSEN W, et al. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials[J]. Nature reviews clinical oncology, 2014, 11(9): 509-524.
- [5] TAGLIAMONTE M, PETRIZZO A, TORNESELLO M L, et al. Antigen-specific vaccines for cancer treatment[J]. Human vaccines & immunotherapeutics, 2014, 10(11): 3332-3346.
- [6] ZIZZARI I G, VEGLIA F, TAURINO F, et al. HER2-based recombinant immunogen to target DCs through Fc γ Rs for cancer immunotherapy[J]. Journal of molecular medicine, 2011, 89(12): 1231-1240.
- [7] OTT P A, HU Z, KESKIN D B, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma[J]. Nature, 2017, 547(7662): 217-221.
- [8] SABADO R L, BALAN S, BHARDWAJ N. Dendritic cell-based immunotherapy[J]. Cell research, 2017, 27(1): 74-95.
- [9] SAKAI K, SHIMODAIRA S, MAEJIMA S, et al. Dendritic cell-based immunotherapy targeting Wilms' tumor 1 in patients with recurrent malignant glioma[J]. Journal of neurosurg, 2015, 123(4): 989-997.
- [10] RONG J, HAN J, DONG L, et al. Glycan imaging in intact rat hearts and glycoproteomic analysis reveal the upregulation of sialylation during cardiac hypertrophy[J]. Journal of the American chemical society, 2014, 136(50): 17468-17476.
- [11] ROUHANIFARD SH, NORDSTROM L U, ZHENG T, et al. Chemical probing of glycans in cells and organisms[J]. Chemical society reviews, 2013, 42(10): 4284-4296.

-
- [12] MILANI A, SANGIOLO D, AGLIETTA M, et al. Recent advances in the development of breast cancer vaccines[J]. Breast cancer, 2014, 6: 159–168.
- [13] NAGORSEN D, THIEL E. Clinical and immunologic responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer[J]. Clinical cancer research; an official journal of the American association for cancer research, 2006, 12(10): 3064–3069.
- [14] RAO B, HAN M, WANG L, et al. Clinical outcomes of active specific immunotherapy in advanced colorectal cancer and suspected minimal residual colorectal cancer: a meta-analysis and system review[J]. Journal of translational medicine, 2011, 9: 17–27.
- [15] PERDICCHIO M, ILARREGUI J M, VERSTEGE M I, et al. Sialic acid-modified antigens impose tolerance via inhibition of T-cell proliferation and de novo induction of regulatory T cells[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2016, 113(12): 3329–3334.
- [16] RIAD A, CHARLES A D, LAUREN A, et al. Activating and inhibitory Fcγ receptors in immunotherapy: being the actor or being the target[J]. Expert review of clinical immunology, 2009, 5(6): 735.
- [17] SONDERMANN P. The FcγR/IgG interaction as target for the treatment of autoimmune diseases[J]. Journal of clinical immunology, 2016, 36(1): 95–99.
- [18] HU Z, OTT P A, WU C J. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer[J]. Nature reviews immunology, 2018, 18(3): 168–182.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第 91 页)

- [23] SIMONICH S L, HITES R A. Organic pollutant accumulation in vegetation[J]. Environmental science & technology, 1995, 29(12): 2905–2914.
- [24] TANOUE R, SATO Y, MOTOYAMA M, et al. Plant uptake of pharmaceutical chemicals detected in recycled organic manure and reclaimed wastewater[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2012, 60(41): 10203–10211.
- [25] PAN M, WONG C K C, CHU L M. Distribution of antibiotics in wastewater-irrigated soils and their accumulation in vegetable crops in the pearl river delta, southern China[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2014, 62(46): 11062–11069.
- [26] ZHANG J Y, WEI Y S, CHEN M X, et al. Occurrence and fate of antibiotic and heavy metal resistance genes in the total process of biological treatment and land application of animal manure: A review[J]. Acta scientiae circumstantiae, 2015, 35(4): 935–946.
- [27] 王婷婷, 陈新建, 徐寸发, 等. 麝香草酚调控水稻幼苗根的耐盐作用[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2017, 40(2): 57–64.

[责任编辑:黄 敏]